Saggio MiSeqDx™ Cystic Fibrosis Clinical Sequencing

Guida di consultazione

PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO

DI PROPRIETÀ DI ILLUMINA
N. codice 15038346 Rev. A
Aprile 2014

Introduzione

Uso previsto

Il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Illumina è un sistema diagnostico *in vitro* per il sequenziamento mirato che risequenzia le regioni di codifica delle proteine e i limiti introne/esone del gene regolatore della conduttanza transmembrana della fibrosi cistica (*CFTR*) in DNA genomico isolato da campioni di sangue intero periferico umano raccolto in K_2EDTA. Il test rileva le varianti di singolo nucleotide e Indel piccoli nella regione sequenziata e inoltre referta su due mutazioni introniche profonde e due delezioni ampie. Il test deve essere usato sullo strumento MiSeqDx Illumina.

Questo test è previsto per contribuire alla diagnosi in individui con sospetta fibrosi cistica (CF). Questo saggio è più appropriato quando il paziente presenta una fibrosi cistica atipica o non classica o quando altri pannelli di mutazioni non sono riusciti a identificare entrambe le mutazioni causanti la malattia. I risultati del test devono essere interpretati da un gruppo di genetisti molecolari certificati o da un esperto equivalente e devono essere usati assieme ad altre informazioni inclusi sintomi clinici, altri test diagnostici e anamnesi familiare.

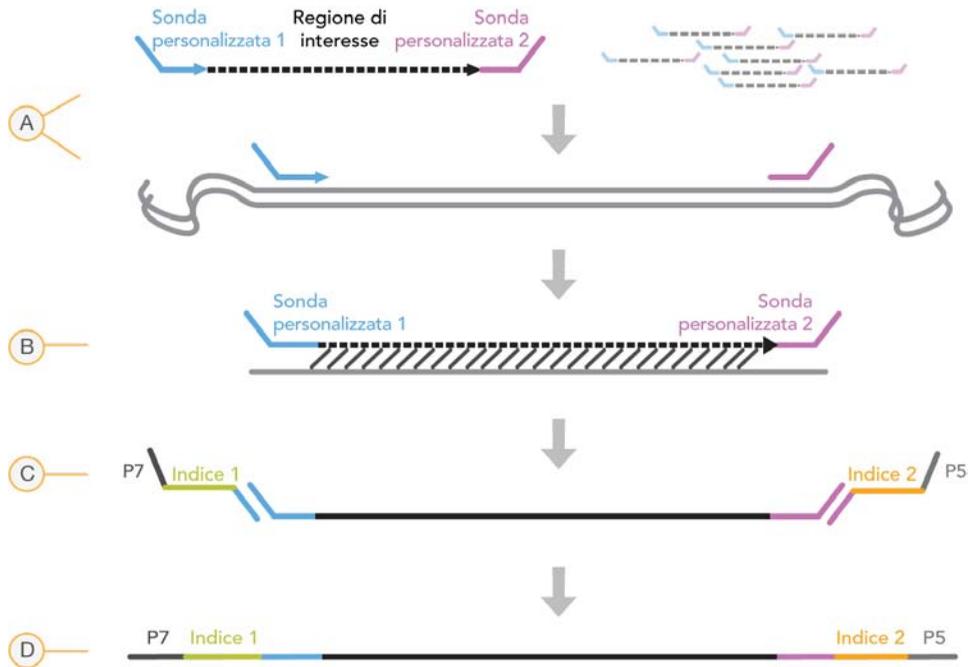
Questo test non è indicato per indipendente diagnosi neonatale, diagnosi prenatale, analisi pre-impianto, screening del portatore, screening dei neonati o screening della popolazione.

Informazioni sulla guida

Nella presente guida di riferimento sono riportate istruzioni più dettagliate, suggerimenti sulle tecniche e cenni utili ai nuovi utenti formati per guidarli nell'esecuzione corretta del protocollo del saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing. La guida ha valore di integrazione e non è intesa a sostituire il foglietto illustrativo contenuto nella confezione.

Come funziona il saggio?

Per ciascun amplicone del gene CFTR è prevista una coppia di oligonucleotidi CF specifica. L'ibridazione di questi oligonucleotidi su DNA genomico avviene in una piastra a 96 pozzetti; successivamente il processo di estensione e ligazione forma templati di DNA costituiti dalle regioni di interesse affiancate da sequenze di primer

universali. Mediante i primer indice forniti con il kit, i templati di DNA vengono amplificati mediante PCR, raggruppati in pool in una singola provetta e sequenziati sullo strumento MiSeqDx.

A Ibridazione di sonde oligonucleotidiche personalizzate
B Estensione e ligazione
C Aggiunta di indici e adattatori di sequenziamento mediante PCR
D Amplicone finale pronto per il sequenziamento con MiSeq

Panoramica del processo

Il processo del saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Illumina può essere riassunto nei seguenti passaggi:

Creazione di un foglio campioni

Innanzitutto, preparare un foglio campioni da utilizzare su MiSeqDx per identificare ciascun campione e l'indice corrispondente. Per preparare il foglio campioni, utilizzare Worklist Manager Illumina, un'applicazione basata su una procedura guidata che consente di registrare l'ID dei campioni, gli indici e altri parametri applicabili alla piastra a 96 pozzetti. Il foglio campioni è utilizzato anche come guida per impostare la piastra durante il flusso di lavoro del saggio.

Preparazione delle librerie

Preparare le librerie utilizzando il protocollo dettagliato nella presente guida per l'utente.

Sequenziamento dei campioni su MiSeqDx

Il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing deve essere sequenziato su uno strumento MiSeqDx mediante una corsa paired-end da 150 cicli. Per istruzioni su come eseguire una corsa di sequenziamento su MiSeqDx, vedere la *Guida di consultazione per lo strumento MiSeqDx (n. codice 15038353_ITA)*.

Sequenziamento automatico e analisi dei dati

MiSeq Reporter elabora le identificazioni delle basi generate dallo strumento MiSeqDx. Si tratta di un software integrato sullo strumento e nei suoi processi. MiSeq Reporter produce informazioni relative all'allineamento e alle varianti strutturali. Per ulteriori informazioni sul software, vedere la *Guida per l'utente di MiSeq Reporter (n. codice 15038356_ITA)*.

Strumenti per il monitoraggio

Illumina fornisce i seguenti strumenti per il monitoraggio e indicazioni sui campioni nel laboratorio:

- È possibile utilizzare il **Modulo di monitoraggio del laboratorio** per registrare dati come il nome dell'operatore, le informazioni sui campioni e gli indici, gli orari di inizio e fine, i numeri di lotto dei reagenti e i codici a barre.
- **Worklist Manager Illumina** è utilizzato per creare il foglio campioni mediante un'applicazione basata su una procedura guidata. Worklist Manager Illumina presenta una funzionalità atta a registrare i parametri per la piastra campioni, come l'ID campione, gli indici doppi e altre caratteristiche applicabili alla corsa.

NOTA

È possibile scaricare i documenti sul saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Illumina descritti sopra dal sito Web Illumina all'indirizzo http://support.illumina.com. Andare alla pagina di supporto del saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Illumina e fare clic sulla scheda **Documentation & Literature** (Documentazione e letteratura).

Informazioni preliminari

In questa sezione sono descritti il contenuto del kit del saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Illumina, i materiali di consumo e le apparecchiature utilizzate, le raccomandazioni per l'input di DNA e le migliori pratiche da adottare durante il protocollo.

Contenuto del kit del saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing

Il kit del saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Illumina contiene i seguenti componenti. Conservare i componenti del kit alla temperatura indicata e in zone designate per la pre-amplificazione e la post-amplificazione.

Dato che i reagenti per la pre-amplificazione e la post-amplificazione vengono consegnati insieme, è importante disimballare i reagenti nella zona di pre-amplificazione e quindi spostare i reagenti per la post-amplificazione nell'apposita area di conservazione.

Saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing, Scatola 1

Tabella 1 Scatola 1A Reagenti pre-amplificazione

Componente	Quantità	Volume di riempimento	Ingredienti attivi	Conservazione
Saggio CF Clinical Sequencing - pool di oligonucleotidi	1 provetta	600 µl	Soluzione acquosa tamponata contenente oligonucleotidi mirati al gene *CFTR*	tra -25 °C e -15 °C
Tampone di ibridazione	1 provetta	4,32 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente sali e formammide	tra -25 °C e -15 °C
Miscela di estensione-ligazione	1 provetta	4,8 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente una miscela proprietaria di DNA polimerasi, DNA ligasi e dNTP	tra -25 °C e -15 °C

Componente	Quantità	Volume di riempimento	Ingredienti attivi	Conservazione
Primer indice C (A503), D (A504) e E (A505)	1 provetta per primer	192 µl	Primer per PCR con sequenze indice e adattatori di sequenziamento	tra -25 °C e -15 °C
Primer indice 1 (A701), 2 (A702) e 10 (A710)	1 provetta per primer	128 µl	Primer per PCR con sequenze indice e adattatori di sequenziamento	tra -25 °C e -15 °C
PCR polimerasi	1 provetta	56 µl	DNA polimerasi proprietaria	tra -25 °C e -15 °C
Master Mix per PCR	1 provetta	2,8 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente sali e dNTP	tra -25 °C e -15 °C

Tabella 2 Scatola 1B Reagenti post-amplificazione

Componente	Quantità	Volume di riempimento	Ingredienti attivi	Conservazione
Diluente normalizzazione libreria	1 provetta	4,6 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente sali, 2-mercaptoetanolo e formammide	tra -25 °C e -15 °C
Tampone di diluizione libreria	1 provetta	4,5 ml	Soluzione acquosa tamponata	tra -25 °C e -15 °C
Controllo interno PhiX	1 provetta	10 µl	Soluzione acquosa tamponata contenente DNA genomico PhiX	tra -25 °C e -15 °C

Saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing, Scatola 2

Tabella 3 Scatola 2 Reagenti post-amplificazione

Componente	Quantità	Indice	Conservazione
Cartuccia MiSeqDx - saggio CF Clinical Sequencing	6 cartucce	Cartuccia monouso che contiene i reagenti per la generazione dei cluster e il sequenziamento da utilizzarsi con MiSeqDx, compresi formammide, 2-mercaptoetanolo e DMSO < 2%.	tra -25 °C e -15 °C

Saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing, Scatola 3

Tabella 4 Scatola 3A Reagenti pre-amplificazione

Componente	Quantità	Volume di riempimento	Ingredienti attivi	Conservazione
Tampone di lavaggio stringente	1 flacone	24 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente sali, 2-mercaptoetanolo e formammide	tra 2 °C e 8 °C
Tampone di lavaggio universale	1 provetta	4,8 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente sali	tra 2 °C e 8 °C

Tabella 5 Scatola 3B Reagenti post-amplificazione

Componente	Quantità	Volume di riempimento	Ingredienti attivi	Conservazione
Microsfere per la pulizia della PCR	1 provetta	5 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente microsfere paramagnetiche in fase solida e polietilene glicole	tra 2 °C e 8 °C
Lavaggio di normalizzazione della libreria	2 provette	4,8 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente sali, 2-mercaptoetanolo e formammide	tra 2 °C e 8 °C
Microsfere libreria	1 provetta	1,2 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente microsfere paramagnetiche in fase solida	tra 2 °C e 8 °C
Cella a flusso MiSeqDx - saggio CF Clinical Sequencing	6 contenitori	1 cella a flusso	Substrato di vetro con oligonucleotidi legati covalentemente	tra 2 °C e 8 °C

Saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing, Scatola 4

Tabella 6 Scatola 4 Reagenti post-amplificazione

Componente	Quantità	Volume di riempimento	Ingredienti attivi	Conservazione
Soluzione SBS MiSeqDx (PR2) - saggio CF Clinical Sequencing	6 flaconi	353,1 ml	Soluzione acquosa tamponata	tra 2 °C e 8 °C

Saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing, Scatola 5

Tabella 7 Scatola 5 Reagenti pre-amplificazione

Componente	Quantità	Volume di riempimento	Ingredienti attivi	Conservazione
Piastra filtro	6 piastre	N.D.	Piastra di microtitolazione in polipropilene con una membrana di polietersulfone modificata	tra 15 °C e 30 °C

Tabella 8 Scatola 5 Reagenti post-amplificazione

Componente	Quantità	Volume di riempimento	Ingredienti attivi	Conservazione
Tampone di eluizione	1 provetta	4,8 ml	Soluzione acquosa tamponata	tra 15 °C e 30 °C
Tampone di conservazione della libreria	1 provetta	3,5 ml	Soluzione acquosa tamponata	tra 15 °C e 30 °C

Reagenti richiesti, non forniti

Reagenti pre-amplificazione

- 10 N NaOH (preparare da compresse o con una soluzione standard)
- Tampone TE
- Acqua priva di DNasi e di RNasi

Reagenti post-amplificazione

- 10 N NaOH (preparare da compresse o con una soluzione standard)
- Etanolo, 200 proof (vol. 100%) per biologia molecolare
- Tampone TE
- Acqua priva di DNasi e di RNasi

Apparecchiatura e materiali

Apparecchiatura e materiali di consumo forniti, venduti separatamente

1. Strumento **MiSeqDx**, n. catalogo DX-410-1001
2. **Kit TruSeq Index Plate Fixture**, n. di catalogo FC-130-1005
3. **Kit TruSeq Index Plate Fixture& Collar,** n. di catalogo FC-130-1007
4. **Tappi sostitutivi per adattatore indice**, n. di catalogo DX-502-1003

Apparecchiatura e materiali richiesti, non forniti

Apparecchiatura e materiali per pre-amplificazione

1. **Blocco termico**: è necessario un blocco termico per una piastra a 96 pozzetti. Il blocco termico deve soddisfare le seguenti specifiche di prestazione. Sono accettabili i blocchi termici con coperchi riscaldati.
   - Intervallo di temperatura: ambiente da +5 °C a 99 °C
   - Regolazione della temperatura: ± 0,1 °C a 37 °C; ± 0,4 °C a 60 °C
2. **Incubatore di campioni**: è necessario un incubatore (forno per ibridazione). L'incubatore deve soddisfare le seguenti specifiche di prestazione.
   - Intervallo di temperatura: da 10 °C a 100 °C
   - Regolazione della temperatura: ± 0,2 °C
3. **Centrifuga da tavolo**: è necessaria una centrifuga da tavolo in grado ci mantenere la temperatura di 20 °C. Come specificato sopra, nell'area di post-

amplificazione è necessaria un'altra centrifuga. Qualsiasi centrifuga per piastre che raggiunga le velocità previste dal protocollo (da 280 a 2.400 × g) è accettabile.

4 **Pipette di precisione**: è necessaria una serie di pipette di precisione. Come specificato sopra, nell'area di post-amplificazione è necessario un altro set. L'utilizzo di pipette di precisione è necessario per assicurare un'erogazione accurata di reagente e campione. È possibile utilizzare sia pipette monocanale che multicanale se calibrate regolarmente e precise entro un margine del 5% del volume stabilito.

5 **Materiali di consumo**: sono necessari i seguenti materiali di consumo.
   - Piastre skirted per PCR a 96 pozzetti, 0,2 ml, polipropilene, o equivalente
     NOTA: assicurarsi che la piastra a 96 pozzetti sia compatibile con il supporto magnetico.
   - Piastre di conservazione a 96 pozzetti, 0,8 ml (piastre MIDI)
   - Bacinella per soluzione, in PVC, priva di DNAasi e RNAasi (vaschetta)
   - Sigillo adesivo in alluminio
   - Sigillo per piastre PCR appropriato
   - Punte di pipette dotate di barriera aerosol

Apparecchiatura e materiali per post-amplificazione

1 **Termociclatore**: è necessario un termociclatore. Il termociclatore deve essere dotato di un coperchio riscaldato e soddisfare le seguenti specifiche di prestazione:
   - Intervallo di controllo della temperatura: da 4 °C a 99 °C
   - Accuratezza del controllo: ± 0,25 °C da 35 °C a 99 °C

2 **Agitatore per micropiastre**: nell'area adibita al laboratorio post-amplificazione è necessario un agitatore di micropiastre. L'agitatore di piastre deve soddisfare le seguenti specifiche di prestazione:
   - Velocità massima di miscelazione: 3.000 rpm (giri/min)
   - Intervallo di velocità di miscelazione: 200-3.000 rpm (giri/min)

3 **Centrifuga da tavolo**: è necessaria una centrifuga da tavolo in grado ci mantenere la temperatura di 20 °C. Come specificato sopra, nell'area di pre-amplificazione è necessaria un'altra centrifuga. Qualsiasi centrifuga per piastre che raggiunga le velocità previste dal protocollo (da 280 a 2.400 × g) è accettabile.

4 **Blocco termico**: è necessario un blocco termico per le provette. Il blocco termico deve soddisfare le seguenti specifiche di prestazione.
   - Intervallo di temperatura: ambiente da +5 °C a 99 °C
   - Regolazione della temperatura: ± 0,1 °C a 37 °C; ± 0,4 °C a 60 °C

5 **Supporto magnetico**: è necessario un supporto magnetico per una piastra a 96 pozzetti. Le prestazioni migliori si osservano quando i magneti si trovano sul lato del supporto e non nella parte inferiore.

6 **Pipette di precisione**: è necessaria una serie di pipette di precisione. Come specificato sopra, nell'area di pre-amplificazione è necessario un altro set. L'utilizzo di pipette di precisione è necessario per assicurare un'erogazione accurata di reagente e campione. È possibile utilizzare sia pipette monocanale che multicanale se calibrate regolarmente e precise entro un margine del 5% del volume stabilito.

7 **Materiali di consumo**: sono necessari i seguenti materiali di consumo.
   - Piastre skirted per PCR a 96 pozzetti, 0,2 ml, polipropilene, o equivalente
   - Piastre di conservazione a 96 pozzetti, 0,8 ml (piastre MIDI)
     NOTA: assicurarsi che la piastra a 96 pozzetti sia compatibile con il supporto magnetico.
   - Provette coniche, 15 ml
   - Provette per microcentrifuga Eppendorf (sono consigliate quelle con tappo a vite)
   - Striscia a otto provette per PCR
   - Bacinelle per soluzione, in PVC, priva di DNAasi e RNAasi (vaschetta)
   - Sigilli adesivi in alluminio
   - Sigilli adesivi per piastre
   - Punte di pipette dotate di barriera aerosol

Impedire la contaminazione da PCR

La PCR è comunemente utilizzata in laboratorio per amplificare sequenze specifiche di DNA. Se non si adottano misure igieniche adeguate nel laboratorio, i prodotti della PCR possono contaminare i reagenti, gli strumenti e i campioni di DNA genomico, portando a risultati inesatti e inaffidabili. La contaminazione da PCR può interrompere i processi del laboratorio e ritardare sensibilmente il normale svolgimento del lavoro.

Accertarsi che il laboratorio abbia attuato le misure necessarie per ridurre il rischio di contaminazione da PCR.

- **Separare fisicamente le aree di pre-amplificazione e post-amplificazione**
  - Separare fisicamente gli spazi del laboratorio dove si eseguono i processi di pre-amplificazione (estrazione, quantificazione e normalizzazione del DNA) dagli spazi in cui si eseguono i processi di post-amplificazione.
  - Non utilizzare mai lo stesso lavandino per lavare le vaschette utilizzate per la pre-amplificazione e la post-amplificazione.
  - Non utilizzare mai lo stesso sistema di purificazione dell'acqua per i processi di pre-amplificazione e post-amplificazione.
  - Conservare tutti i materiali usati per i protocolli nell'area di pre-amplificazione e portarli nell'area di post-amplificazione secondo necessità.
- **Utilizzare apparecchiature e materiali dedicati**
  - Dedicare set completi separati di apparecchiature e materiali (pipette, centrifughe, forno, blocco termico ecc.) ai processi di pre-amplificazione e post-amplificazione e impedirne la condivisione tra le due aree.
  - Dedicare aree di conservazione separate (congelatori e frigoriferi) ai materiali di consumo pre-amplificazione e post-amplificazione.

Dato che i reagenti per la pre-amplificazione e la post-amplificazione vengono consegnati insieme, è importante disimballarli nell'area di pre-amplificazione e quindi spostare i reagenti per la post-amplificazione nell'apposita area di conservazione.

Procedure di pre-amplificazione e post-amplificazione

Per impedire la contaminazione da PCR, è importante adottare procedure di laboratorio e attenersi alle pratiche migliori. Illumina consiglia di pulire ogni giorno e ogni settimana le aree del laboratorio con sodio ipoclorito allo 0,5% (candeggina al 10%).

ATTENZIONE

Onde evitare la degradazione del campione o del reagente, accertarsi che tutti i vapori della soluzione detergente si siano dissipati completamente prima di iniziare qualsiasi processo.

Pulizia quotidiana dell'area di pre-amplificazione

Una pulizia quotidiana dell'area di pre-amplificazione con sodio ipoclorito allo 0,5% (candeggina al 10%) contribuisce a eliminare i prodotti della PCR entrati nell'area di

pre-amplificazione.

Identificare le aree di pre-amplificazione a maggior rischio di contaminazione e pulirle con una soluzione di sodio ipoclorito allo 0,5% (candeggina al 10%) prima di iniziare qualsiasi processo di pre-amplificazione. Aree ad alto rischio comprendono, in via esemplificativa, i seguenti elementi:

- ripiani dei banchi
- maniglie delle porte
- maniglie di frigoriferi/congelatori
- mouse di computer
- tastiere

Pulizia quotidiana dell'area di post-amplificazione

Ridurre la quantità di prodotti della PCR nell'area di post-amplificazione contribuisce a ridurre il rischio di contaminazione nell'area di pre-amplificazione. La pulizia quotidiana dell'area di post-amplificazione mediante sodio ipoclorito allo 0,5% (candeggina al 10%) contribuisce a tale risultato.

Identificare le aree di post-amplificazione a maggior rischio di contaminazione e pulirle ogni giorno con una soluzione di sodio ipoclorito allo 0,5% (candeggina al 10%). Aree ad alto rischio comprendono, in via esemplificativa, i seguenti elementi:

- termociclatori
- area del banco utilizzata per elaborare il DNA amplificato
- maniglie delle porte
- maniglie di frigoriferi/congelatori
- mouse di computer
- tastiere

Pulizia settimanale di tutte le aree del laboratorio

Una volta alla settimana, eseguire una pulizia profonda delle aree di pre-amplificazione e post-amplificazione con sodio ipoclorito allo 0,5% (candeggina al 10%)

- Pulire i ripiani dei banchi e le superfici del laboratorio.
- Pulire tutti gli strumenti che non vengono puliti ogni giorno.
- Lavare a fondo i pavimenti del laboratorio.
- Assicurarsi che il personale responsabile della pulizia settimanale sia adeguatamente preparato sulla prevenzione della contaminazione da PCR.

Oggetti caduti sul pavimento

Il pavimento è contaminato dai prodotti della PCR trasferiti sulle scarpe delle persone provenienti dall'area di post-amplificazione, pertanto qualsiasi oggetto che cada sul pavimento deve essere trattato come contaminato.

- Gli oggetti monouso caduti sul pavimento, come provette vuote, punte di pipette, guanti, appendiabiti devono essere smaltiti.
- Gli oggetti non monouso caduti sul pavimento, come una pipetta o un contenitore di campioni importante, devono essere puliti immediatamente e a fondo con soluzione di sodio ipoclorito allo 0,5% (candeggina al 10%) per rimuovere la contaminazione da PCR.
- Pulire qualsiasi superficie del laboratorio entrata in contatto con l'oggetto contaminato. Le persone che manipolano qualsiasi oggetto caduto sul pavimento, monouso o non, devono smaltire i propri guanti da laboratorio e indossarne un paio nuovo.

Precauzioni

Durante la preparazione delle librerie per il sequenziamento mediante il presente protocollo, attenersi alle raccomandazioni seguenti.

Garantire la coerenza

- **Utilizzare pipette multicanale**: per garantire la coerenza fra i campioni, ove possibile, utilizzare una pipetta multicanale. Calibrare le pipette regolarmente.
- **Coerenza per preparazioni di campioni più piccoli**: ciascuna provetta di reagente fornita con il kit contiene un volume sufficiente a produrre risultati usando pipette manuali e vaschette di reagenti seguendo le tecniche standard di laboratorio. Per garantire la precisione nell'erogazione dei volumi dei reagenti, pipettare singolarmente i reagenti in ciascun pozzetto o pipettare con una pipetta multicanale in una striscia a 8 provette per PCR.

Manipolazione delle microsfere magnetiche

- **Utilizzo a temperatura ambiente**: prima dell'uso, lasciare che le microsfere raggiungano la temperatura ambiente.

- **Agitare fino a sospensione completa**: immediatamente prima dell'uso, agitare le microsfere finché raggiungono la completa sospensione e il colore appare omogeneo.
- **Miscelare a fondo i campioni**: dopo aver aggiunto le microsfere ai campioni, miscelare a fondo pipettando su e giù dieci volte. Illumina consiglia anche di utilizzare un agitatore per miscelare a fondo i campioni.
- **Consentire un legame massimo**: per ottenere i risultati migliori, incubare le miscele di microsfere/campioni a temperatura ambiente per tutta la durata indicata sul protocollo.
- **Aspirare lentamente la soluzione trasparente**: dopo aver posizionato la piastra sul supporto magnetico, attendere finché la soluzione diventa trasparente prima di procedere. Tenere la piastra sul supporto magnetico durante l'aspirazione lenta della soluzione trasparente, facendo attenzione a non toccare le microsfere separate.

Evitare la contaminazione incrociata

- **Sostituire le punte fra l'erogazione dei reagenti e dei campioni**: utilizzare sempre punte di pipette nuove fra l'erogazione dei reagenti e quella dei campioni.
- **Miscelare le piastre seguendo le indicazioni**: miscelare i campioni con una pipetta multicanale e centrifugare la piastra quando indicato. Non agitare le piastre.
- **Utilizzare punte dotate di barriera aerosol**: l'utilizzo di punte di pipette dotate di barriera aerosol riduce il rischio di contaminazione incrociata da carry-over di ampliconi o da campione a campione.

Lavaggio con etanolo all'80% durante la fase di pulizia della PCR

- **Preparare sempre al momento etanolo all'80%**: preparare sempre al momento etanolo all'80% per le fasi di lavaggio. L'etanolo può assorbire l'acqua dall'aria e influire sui risultati.
- **Rimuovere tutto l'etanolo dai pozzetti**: assicurarsi che tutto l'etanolo venga rimosso dal fondo dei pozzetti, in quanto può contenere residui di contaminanti. Utilizzare una pipetta multicanale P20 per rimuovere l'etanolo residuo e accelerare l'asciugatura.
- **Consentire l'evaporazione completa**: consentire un tempo di asciugatura di almeno cinque minuti fuori dal supporto magnetico a temperatura ambiente per

l'evaporazione completa. L'etanolo residuo può influire sulle prestazioni delle reazioni successive.

Requisiti di input di DNA

- Per il protocollo del saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Illumina sono necessari 250 ng di DNA genomico. Illumina consiglia vivamente di quantificare il materiale genomico iniziale.
- **Quantificazione del DNA di input**: quantificare il materiale genomico iniziale mediante metodi spettrofotometrici UV basati su letture OD A260/A280.
- **Valutazione della qualità del DNA**: per quantificare il DNA si utilizzano comunemente le misurazioni dell'assorbanza a 260 nm. Il rapporto fra l'assorbanza a 260 nm e a 280 nm viene utilizzato come indicazione di purezza del campione. Il protocollo è ottimizzato per DNA con valori del rapporto di assorbanza maggiori di 1,5.

Controlli qualità

- Le buone pratiche di laboratorio dispongono che in ogni corsa siano inclusi un campione di DNA di controllo positivo e un campione di controllo negativo (non templato).
- Il campione di DNA di controllo positivo deve essere un campione ben caratterizzato con una mutazione nota del CFTR.
- Illumina raccomanda inoltre di includere in ciascuna corsa un controllo wild type.

Acronimi

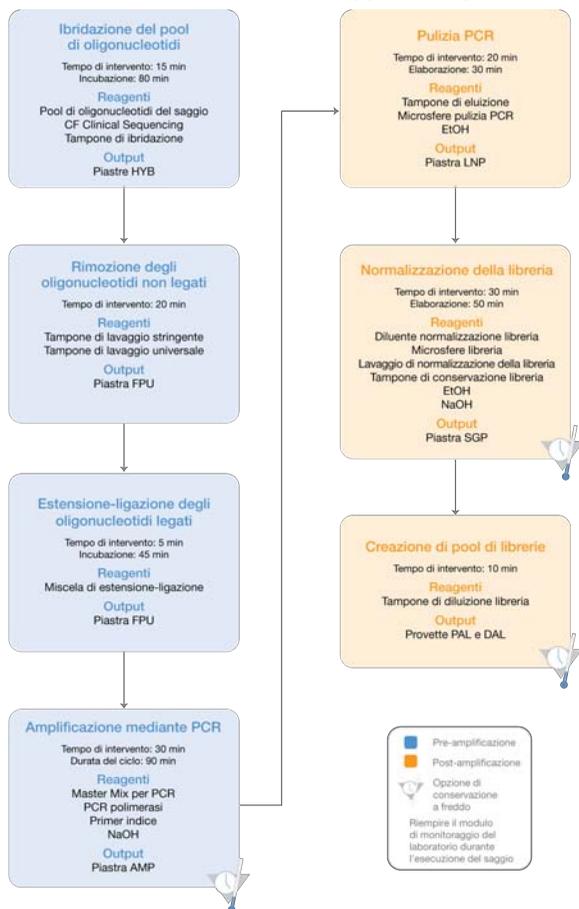
Tabella 9 Acronimi per il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Illumina

Acronimo	Definizione
AMP	Piastra di amplificazione
CLP	Piastra di pulizia
DAL	Libreria di ampliconi diluita

Acronimo	Definizione
FPU	Unità piastra filtro
HYB	Piastra di ibridazione
LNP	Piastra di normalizzazione della libreria
NTC	Controllo con templato negativo
PAL	Libreria di ampliconi raggruppati in pool
POS (Posizione)	Controllo positivo
SGP	Piastra di conservazione

Flusso di lavoro del saggio

Il diagramma seguente illustra il flusso di lavoro del saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Illumina. Fra i vari passaggi sono contrassegnati i punti di arresto sicuri.

Figura 1 Flusso di lavoro del saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Illumina

Preparazione del foglio campioni per MiSeqDx

1. Nella schermata Welcome (Benvenuto) di Worklist Manager Illumina, selezionare **Create Worklist** (Crea lista di lavoro). Viene visualizzata la schermata Enter Run Parameters (Immetti parametri della corsa).

   Figura 2 Illumina Worklist Manager, schermata Enter Run Parameters (Immetti parametri della corsa)

2. Nel campo Test Type (Tipo di test), selezionare **CF Clinical Sequencing Assay** (Saggio CF Clinical Sequencing).
3. Nel campo Worklist Name (Nome lista di lavoro), immettere il nome per il foglio campioni. Questo è un campo obbligatorio.
   - Se per il nome del foglio campioni viene utilizzato l'ID alfanumerico del codice a barre della cartuccia di reagenti, il software operativo MiSeq (MOS) troverà automaticamente il foglio campioni. L'ID del codice a barre si trova sull'etichetta della cartuccia di reagenti proprio sotto il codice a barre.
   - Se per il foglio campioni viene utilizzato un qualsiasi altro nome, il pulsante **Browse** (Sfoglia) nel software operativo MiSeq (MOS) può essere utilizzato per trovare il foglio campioni corretto.
4. [Opzionale] Immettere una descrizione per identificare la corsa.
5. Assicurarsi che la data corrisponda alla data di inizio della corsa. La data attuale appare per impostazione predefinita.

6 Selezionare **Next** (Avanti). Viene visualizzata la schermata Enter Sample Parameters (Immetti informazioni campioni).

Figura 3 Illumina Worklist Manager, schermata Enter Sample Information (Immetti informazioni sui campioni)

Inserimento di informazioni sui campioni

1 Nella scheda Table (Tabella) o nella scheda Plate (Piastra), inserire le seguenti informazioni per ciascun pozzetto contenente campione:

  a **Sample ID** (ID campione): inserire un ID campione univoco. L'ID campione viene usato per monitorare il campione dalla preparazione attraverso il sequenziamento fino all'analisi. Normalmente, l'ID è un codice a barre; tuttavia, sono accettabili tutti i valori.

  b **Index 1 e Index 2** (Indice 1 e Indice 2): specificare l'adattatore dell'indice che verrà utilizzato per ogni Lettura indici. Illumina consiglia di utilizzare le combinazioni che producono almeno una base A o C (rosso) e almeno una base G o T (verde) per ogni ciclo.

NOTA
Per informazioni su come scegliere gli indici appropriati, vedere *Rendimento dei campioni e rappresentazione dell'indice* a pagina 23.

2 [Opzionale] Per registrare informazioni più dettagliate sui campioni, inserire il nome e la descrizione di un campione.

3 [Opzionale] Per identificare i controlli sulla piastra, selezionare Negative (Negativo) o Positive (Positivo) dal menu a discesa **Control** (Controllo).

4 Andare alla scheda Plate Graphic (Schema piastra) e utilizzare l'opzione **Copy to Clipboard** (Copia in appunti) o **Print** (Stampa) per acquisire un'immagine della piastra campioni.

Figura 4 Illumina Worklist Manager, scheda Plate Graphic (Schema piastra)

5 Selezionare **Finish** (Fine).

Rendimento dei campioni e rappresentazione dell'indice

Per il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Illumina, il rendimento dei campioni per corsa di MiSeqDx è di 8 campioni. I primer di indicizzazione usati durante l'amplificazione mediante PCR devono essere scelti in base al rendimento dei campioni finale desiderato per garantire diversità nella sequenza d'indice.

MiSeqDx utilizza un LED verde per il sequenziamento delle basi G/T e un LED rosso per il sequenziamento delle basi A/C. Per garantire la corretta registrazione, a ogni corsa deve essere letto almeno uno dei due nucleotidi per ogni canale cromatico. È importante conservare l'equilibrio cromatico per ciascuna base di lettura indici sequenziata, altrimenti potrebbe verificarsi un problema di registrazione durante il sequenziamento della Lettura indici.

Utilizzare il seguente set minimo di indici con bilanciamento dei colori per corse di sequenziamento di otto campioni:

Tabella 10 Combinazioni primer indice per corse di sequenziamento a 8 campioni

	Primer indice 1 (A701)	**Primer indice 2 (A702)**	**Primer indice 10 (A710)**
Primer indice C (A503)	Campione 1	Campione 2	Campione 3
Primer indice D (A504)	Campione 4	Campione 5	Campione 6
Primer indice E (A505)	Campione 7	Campione 8	--

Se non sono disponibili sei campioni univoci (esclusi i controlli positivi e negativi), è accettabile completare la corsa con replicati di qualsiasi campione di DNA genomico umano.

Ibridazione del pool di oligonucleotidi

Questo passaggio consiste nell'ibridazione del pool di oligonucleotidi per la fibrosi cistica contenente oligonucleotidi a monte e a valle specifici del gene regolatore di conduttanza transmembrana della fibrosi cistica (CFTR) con campioni di DNA genomico.

AVVERTENZA

Questo set di reagenti contiene formammide, una ammide alifatica che è una probabile tossina riproduttiva. L'inalazione, l'ingestione, il contatto con la pelle o con gli occhi possono causare lesioni personali. Smaltire i contenitori e i contenuti non utilizzati in conformità alle norme locali di sicurezza vigenti.

Per ulteriori informazioni, vedere le SDS per questo kit, all'indirizzo support.illumina.com/sds.ilmn.

Tempo stimato

- Durata totale: 1 ora e 35 minuti
- Tempo di intervento dell'operatore: 15 minuti

Materiali di consumo

Elemento	Quantità	Conservazione	Fornito da
Saggio CF Clinical Sequencing - pool di oligonucleotidi	1 provetta	tra -25 °C e -15 °C	Illumina
Tampone di ibridazione	1 provetta	tra -25 °C e -15 °C	Illumina
DNA genomico (quantità consigliata: 50 ng/µl)	5 µl	tra -25 °C e -15 °C	Utente
Piastra skirted per PCR a 96 pozzetti	1 piastra	tra 15 °C e 30 °C	Utente
Sigillo adesivo in alluminio	2 sigilli	tra 15 °C e 30 °C	Utente
Vaschette sterili	Come necessario	tra 15 °C e 30 °C	Utente

Preparazione

1 Rimuovere il saggio CF Clinical Sequencing - pool di oligonucleotidi, il tampone di ibridazione, i campioni di DNA genomico e il campione di controllo positivo dal luogo di conservazione tra -25 °C e -15 °C e lasciarlo scongelare a temperatura ambiente.

2 Inserire in un agitatore il saggio CF Clinical Sequencing - pool di oligonucleotidi e il tampone di ibridazione e agitare vigorosamente per assicurarsi che tutti i precipitati si siano completamente disciolti, quindi centrifugare brevemente le provette per raccogliere il liquido.

NOTA
Prima di utilizzare il tampone di ibridazione, porre la provetta davanti a una luce ed eseguire un controllo visivo per assicurarsi che tutti i precipitati si siano completamente sciolti.

3 Impostare un blocco termico per piastra a 96 pozzetti su 95 °C.

4 Preriscaldare un incubatore a 37 °C per prepararsi alla fase di estensione-ligazione.

5 Creare la piastra campioni in base all'immagine stampata da IWM. Controllare la corrispondenza della posizione dei controlli positivi e negativi. Illumina consiglia di analizzare i campioni in lotti non inferiori a otto.

NOTA
L'uso dei controlli consente all'Assistenza tecnica Illumina di garantire un'assistenza efficace nella risoluzione dei problemi. L'Assistenza tecnica Illumina non fornisce assistenza salvo queste reazioni di controllo fossero incluse nella corsa.

Procedura

1 Etichettare una nuova piastra PCR a 96 pozzetti "**HYB_Plate_ID**".

2 Aggiungere 5 µl di campione o controllo a 50 ng/µl (250 ng totali) ai pozzetti appropriati nella piastra **HYB**. Seguire il layout della piastra generato per la corretta selezione dei pozzetti.

NOTA
Verificare che il layout dei campioni di DNA e le posizioni dei controlli positivi e negativi corrispondano nello schema della piastra.

3 Utilizzando una pipetta multicanale, aggiungere 5 µl del saggio CF Clinical Sequencing - pool di oligonucleotidi a tutti i pozzetti contenenti il DNA genomico. Cambiare le punte dopo ciascuna colonna onde evitare una contaminazione incrociata.

4 Utilizzando una pipetta multicanale, aggiungere 40 µl di tampone di ibridazione a ogni campione nella piastra **HYB**. Pipettare delicatamente su e giù 3-5 volte per miscelare. Cambiare le punte dopo ciascuna colonna onde evitare una contaminazione incrociata.

NOTA
Controllare che eventuali cristalli o precipitato in tampone di ibridazione si siano sciolti.

NOTA
Non mescolare il saggio CF Clinical Sequencing - pool di oligonucleotidi e il tampone di ibridazione per la conservazione. Usato in combinazione, il saggio CF Clinical Sequencing - pool di oligonucleotidi diventa instabile, anche se conservato congelato.

5 Sigillare la piastra **HYB** con un foglio di alluminio adesivo e assicurare la chiusura con un rullo di gomma o un cuneo sigillante.

6 Centrifugare a 1.000 x g a 20 °C per 1 minuto.

7 Inserire la piastra **HYB** nel blocco preriscaldato a 95 °C e incubare per 1 minuto.

8 Ridurre la temperatura del blocco termico preriscaldato a 40 °C e proseguire l'incubazione fino a quando il blocco di calore raggiunge i 40 °C. Il tempo di rampa è di circa 80 minuti.

NOTA
Durante l'incubazione, la temperatura del blocco termico si riduce gradualmente da 95 °C a 40 °C. Tipicamente questo processo richiede 80 minuti. Questo raffreddamento graduale è essenziale per un'ibridazione corretta; pertanto, per questo processo non si consigliano termociclatori per PCR con raffreddamento attivo (ad es., Peltier, raffreddato termoelettricamente).

PUNTO DI ARRESTO SICURO
Quando il blocco termico raggiunge i 40 °C, la piastra **HYB** è stabile a una temperatura di 40 °C per 2 ore.

Rimozione degli oligonucleotidi non legati

Questo processo consiste nella rimozione di oligonucleotidi non legati dal DNA genomico mediante un filtro in grado di selezionare le dimensioni. Due fasi di lavaggio con il tampone di lavaggio stringente garantiscono la rimozione completa degli oligonucleotidi non legati. Una terza fase di lavaggio con il tampone di lavaggio universale rimuove il tampone di lavaggio stringente residuo e prepara i campioni per la fase di estensione-ligazione.

AVVERTENZA

Questo set di reagenti contiene formammide, una ammide alifatica che è una probabile tossina riproduttiva. L'inalazione, l'ingestione, il contatto con la pelle o con gli occhi possono causare lesioni personali. Smaltire i contenitori e i contenuti non utilizzati in conformità alle norme locali di sicurezza vigenti.

Per ulteriori informazioni, vedere le SDS per questo kit, all'indirizzo support.illumina.com/sds.ilmn.

Tempo stimato

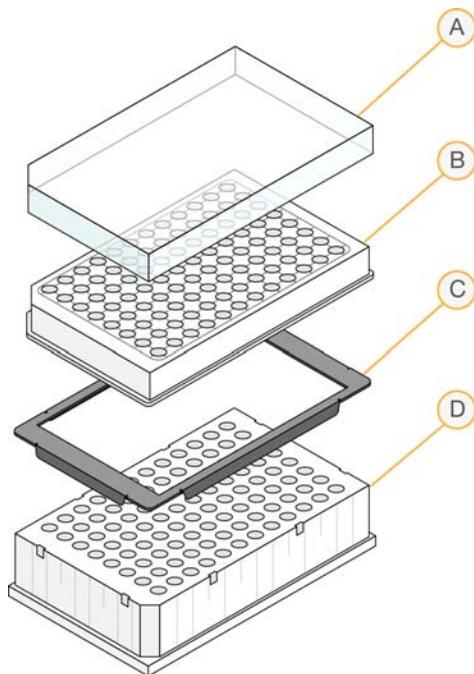
- Durata totale: 20 minuti
- Tempo di intervento dell'operatore: 20 minuti

Materiali di consumo

Elemento	Quantità	Conservazione	Fornito da
Miscela di estensione-ligazione	1 provetta	tra -25 °C e -15 °C	Illumina
Tampone di lavaggio stringente	1 flacone	tra 2 °C e 8 °C	Illumina
Tampone di lavaggio universale	1 provetta	tra 2 °C e 8 °C	Illumina
Piastra filtro	1 piastra	tra 15 °C e 30 °C	Illumina
Colletto adattatore	1 piastra	tra 15 °C e 30 °C	Illumina
Piastra MIDI	1 piastra	tra 15 °C e 30 °C	Utente
Vaschette	Come necessario	tra 15 °C e 30 °C	Utente

Preparazione

1 Prelevare la miscela di estensione-ligazione dalla temperatura di conservazione compresa tra -25 °C e -15 °C e scongelare a temperatura ambiente.
   La miscela di estensione-ligazione viene utilizzato nella fase di estensione-ligazione e impiega circa 20 minuti per scongelarsi.
2 Estrarre il tampone di lavaggio stringente e il tampone di lavaggio universale dalla temperatura di conservazione compresa tra 2 °C e 8 °C e tenerli da parte a temperatura ambiente.
3 Assemblare l'unità piastra filtro (**FPU**) nell'ordine seguente (dall'alto verso il basso):

Figura 5 Unità piastra filtro

A Coperchio
B Piastra filtro
C Colletto adattatore

D Piastra MIDI

4 Etichettare la piastra filtro "**FPU_Plate_ID**". L'ID piastra deve corrispondere all'ID utilizzato per la piastra **HYB**.

5 Pre-lavare la membrana della piastra filtro come segue:
   a Con una pipetta multicanale, dispensare 45 µl di tampone di lavaggio stringente in ciascun pozzetto.
   b Coprire la piastra **FPU** con il coperchio della piastra filtro e tenerla coperta durante ogni fase di centrifugazione.
   c Centrifugare la piastra **FPU** a 2.400 x g a 20 °C per 5 minuti.

Procedura

1 Una volta completata l'ibridazione, confermare che il blocco termico si sia raffreddato a 40 °C. Mentre la piastra **HYB** si trova ancora nel blocco termico, rinforzare i sigilli con un rullo di gomma o un cuneo sigillante. Se non si raggiungono i 40 °C in 80 minuti, continuare a incubare fino al raffreddamento del blocco termico a 40 °C.

2 Estrarre la piastra **HYB** dal blocco termico e centrifugare a 1.000 x g a 20 °C per 1 minuto per raccogliere il condensato.

3 Con una pipetta multicanale impostata su 60 µl, trasferire l'intero volume di ciascun campione nel centro dei corrispondenti pozzetti precedentemente lavati della piastra filtro. Cambiare le punte dopo ciascuna colonna onde evitare una contaminazione incrociata.

4 Coprire la piastra filtro con il coperchio e centrifugare a 2.400 x g a 20 °C per 5 minuti.

5 Lavare la piastra filtro come segue:
   a Con una pipetta multicanale, dispensare 45 µl di tampone di lavaggio stringente in ciascun pozzetto contenente il campione.
   Non è necessario cambiare le punte quando si cambia colonna se si fa attenzione a evitare la contaminazione incrociata.
   b Coprire la piastra filtro con il coperchio e centrifugare a 2.400 x g a 20 °C per 5 minuti.

6 Ripetere il lavaggio nel modo seguente:

a. Con una pipetta multicanale, dispensare 45 µl di tampone di lavaggio stringente in ciascun pozzetto contenente il campione.
   Non è necessario cambiare le punte quando si cambia colonna se si fa attenzione a evitare la contaminazione incrociata.
b. Coprire la piastra filtro con il coperchio e centrifugare a 2.400 x g a 20 °C per 5 minuti.
c. Se il tampone di lavaggio non fa defluire tutto il liquido, centrifugare nuovamente la piastra filtro a 2.400 x g a 20 °C per 5 minuti.

7. Smaltire tutto il materiale defluito (contenente formammide) raccolto fino a quel momento in un apposito contenitore per rifiuti pericolosi, quindi riassemblare l'**FPU**. La stessa piastra MIDI può essere riutilizzata per il resto del processo di pre-amplificazione.

8. Con una pipetta multicanale, dispensare 45 µl di tampone di lavaggio universale in ciascun pozzetto contenente il campione.
   Non è necessario cambiare le punte quando si cambia colonna se si fa attenzione a evitare la contaminazione incrociata.

9. Coprire la piastra filtro con il coperchio e centrifugare a 2.400 x g a 20 °C per 10 minuti.

NOTA
Accertarsi che tutto il liquido sia defluito dopo la centrifugazione. Ripetere la centrifugazione se necessario. I residui di tampone di lavaggio potrebbero inibire le successive reazioni enzimatiche.

Estensione-ligazione degli oligonucleotidi legati

Questo processo collega gli oligonucleotidi ibridati a monte e a valle. Una DNA polimerasi si estende dall'oligonucleotide a monte fino alla regione target e successivamente si lega all'estremità 5' dell'oligonucleotide a valle mediante una DNA ligasi. Il risultato consiste nella formazione di prodotti contenenti le regioni di interesse target affiancate da sequenze necessarie per l'amplificazione.

Tempo stimato

- Durata totale: 50 minuti
- Tempo di intervento dell'operatore: 5 minuti

Materiali di consumo

Elemento	Quantità	Conservazione	Fornito da
Miscela di estensione-ligazione	1 provetta	tra -25 °C e -15 °C	Illumina
Sigillo adesivo in alluminio	1 sigillo	tra 15 °C e 30 °C	Utente
Vaschette	Come necessario	tra 15 °C e 30 °C	Utente

Procedura

1. Utilizzando una pipetta multicanale, aggiungere 45 µl di miscela di estensione-ligazione a ogni pozzetto di campione della piastra filtro. La reazione di estensione-ligazione si verifica sulla membrana della piastra filtro.
   Non è necessario cambiare le punte quando si cambia colonna se si fa attenzione a evitare la contaminazione incrociata.
2. Sigillare la piastra filtro con un foglio di alluminio adesivo, quindi coprire con il coperchio per fissare il foglio durante l'incubazione.
3. Incubare l'intero gruppo **FPU** nell'incubatore preriscaldato a 37 °C per 45 minuti.

4 Durante l'incubazione della piastra **FPU**, preparare l'AMP (piastra di amplificazione) come descritto nella sezione successiva.

Amplificazione mediante PCR

Questo passaggio consiste nell'amplificazione dei prodotti del processo di estensione-ligazione mediante primer che aggiungono sequenze di indici per il multiplex campioni, oltre a comuni adattatori necessari per la generazione dei cluster.

Tempo stimato

- Durata totale: circa 90 minuti
- Tempo di intervento dell'operatore: 30 minuti

Materiali di consumo

Elemento	Quantità	Conservazione	Fornito da
Master Mix per PCR	1 provetta	tra -25 °C e -15 °C	Illumina
Primer indice C (A503), D (A504) e E (A505)	1 provetta per primer	tra -25 °C e -15 °C	Illumina
Primer indice 1 (A701), 2 (A702) e 10 (A710)	1 provetta per primer	tra -25 °C e -15 °C	Illumina
PCR polimerasi	1 provetta	tra -25 °C e -15 °C	Illumina
Sigillo per piastre PCR appropriato	1	tra 15 °C e 30 °C	Utente
0,05 N NaOH preparato al momento	Come necessario	tra 15 °C e 30 °C	Utente
Piastra skirted per PCR a 96 pozzetti	1 piastra	tra 15 °C e 30 °C	Utente
Vaschette	Come necessario	tra 15 °C e 30 °C	Utente

Preparazione

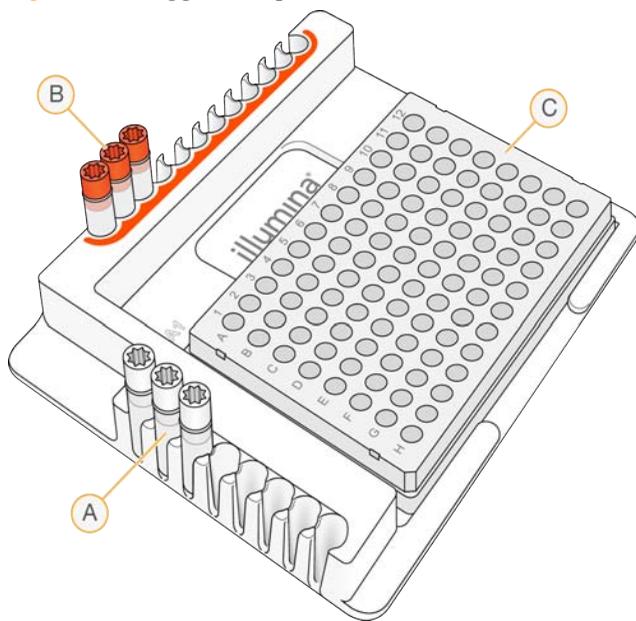
1 Preparare 0,05 N di NaOH fresco aggiungendo 25 µl di 10 N di NaOH a 4.975 µl di acqua sterile.

2 Determinare i primer indice da utilizzare in base alla stampa dello schema della piastra di Worklist Manager Illumina.

3 Rimuovere Master Mix per PCR e i primer indice appropriati dal luogo di conservazione tra -25 °C e -15 °C, quindi scongelarli sul banco a temperatura ambiente.
Per lo scongelamento dei reagenti, attendere circa 20 minuti.

4 Dopo che i primer indice sono completamente scongelati, agitare ogni provetta per miscelare e centrifugare brevemente le provette in una microcentrifuga. Utilizzare provette Eppendorf da 1,7 ml come adattatori per la microcentrifuga.

5 Disporre i primer in un rack utilizzando le seguenti disposizioni:
   a Disporre le provette con i primer Primer indice C (A503), D (A504) e E (A505) (tappo bianco, soluzione trasparente) verticalmente, allineate alle righe da A a H.
   b Disporre le provette con i primer Primer indice 1 (A701), 2 (A702) e 10 (A710) (tappo arancione, soluzione gialla) orizzontalmente, allineate alle colonne da 1 a 12.

Figura 6 Fissaggio della piastra indice

A Primer indice C (A503), D (A504) e E (A505) - tappi bianchi
B Primer indice 1 (A701), 2 (A702) e 10 (A710) - tappi arancioni
C Piastra **AMP**

6 Etichettare una nuova piastra per PCR a 96 pozzetti **AMP** (piastra di amplificazione).

7 Dispensare i primer indice sulla piastra **AMP** in base al foglio campioni come segue:

   a Utilizzando una pipetta multicanale, dispensare 4 µl dei primer indice C (A503), D (A504) e E (A505) (soluzione trasparente) nei pozzetti appropriati in una colonna della piastra **AMP**. La sostituzione delle punte tra le colonne non è necessaria.

   b Per evitare la contaminazione incrociata, smaltire i tappi *bianchi* originali e applicare tappi *bianchi* nuovi.

   c Utilizzando una pipetta multicanale, dispensare 4 µl dei primer indice 1 (A701), 2 (A702) e 10 (A710) (soluzione gialla) nei pozzetti appropriati in una

riga della piastra **AMP**. ***Le punte devono essere sostituite dopo ogni riga per evitare la contaminazione incrociata.***

d Per evitare la contaminazione incrociata, smaltire i tappi *arancioni* originali e applicare tappi *arancioni* nuovi. Rimuovere tutte le provette di primer indice dall'area di lavoro.

8 Preparare la soluzione di lavoro per la PCR con Master Mix per PCR/PCR polimerasi nel modo seguente:

a Dispensare 5,6 µl di PCR polimerasi su 280 µl di Master Mix per PCR.

b Capovolgere 20 volte la soluzione di lavoro per la PCR preparata per miscelarla.

Nella prossima sezione, questa soluzione di lavoro verrà dispensata sulla piastra **AMP**. La soluzione di lavoro per la PCR si mantiene stabile a temperatura ambiente per 10 minuti.

NOTA
Aggiungere sempre PCR polimerasi a Master Mix per PCR subito prima dell'uso. Non conservare mai la soluzione di lavoro per PCR combinata.

Procedura

1 Una volta completata la reazione di estensione-ligazione di 45 minuti, rimuovere la piastra **FPU** dall'incubatore. Rimuovere il sigillo in alluminio e sostituirlo con il coperchio della piastra filtro.
Si raccomanda di rimuovere il sigillo in allumino prima della centrifugazione per garantire che il surnatante di reazione possa defluire efficacemente nella piastra degli scarti.

2 Centrifugare la piastra **FPU** a 2.400 x g a 20 °C per 2 minuti.

3 Utilizzando una pipetta multicanale, aggiungere 25 µl di 0,05 N di NaOH a ogni pozzetto di campione sulla piastra filtro. Prestando attenzione che le punte della pipetta entrino in contatto con la membrana, pipettare NaOH su e giù 5-6 volte. Le punte devono essere sostituite dopo ogni colonna.

4 Coprire e incubare la piastra filtro a temperatura ambiente per 5 minuti.

5 Durante l'incubazione della piastra filtro, utilizzare una pipetta multicanale per trasferire 22 µl della soluzione di lavoro per PCR in ogni pozzetto della piastra AMP contenente i primer indice. Sostituire le punte quando si passa da un campione all'altro.

6. Trasferire i campioni eluiti dal filtro alla piastra AMP come segue:
   a. Impostare una pipetta multicanale P20 su 20 µl.
   b. Pipettare i campioni nella prima colonna della piastra filtro su e giù 5-6 volte.
   c. Trasferire 20 µl dalla piastra filtro alla colonna corrispondente della piastra **AMP**.
   d. Pipettare delicatamente su e giù 5-6 volte per miscelare accuratamente il DNA con la soluzione di lavoro per PCR.

NOTA
Inclinare leggermente la piastra **FPU** per garantire la completa aspirazione ed evitare la formazione di bolle d'aria.

   e. Trasferire le colonne restanti dalla piastra filtro alla piastra **AMP** in modo simile. ***Le punte devono essere sostituite dopo ogni colonna per evitare la contaminazione incrociata.***
   f. Dopo che tutti i campioni sono stati trasferiti, la piastra MIDI di raccolta degli scarti della piastra **FPU** può essere smaltita. Il colletto adattatore in metallo deve essere pulito e conservato per l'uso futuro.
7. Coprire la piastra **AMP** con l'apposito sigillo e assicurarlo con un rullo di gomma.
8. Centrifugare a 1.000 x g a 20 °C per 1 minuto.
9. Trasferire la piastra **AMP** nell'area di post-amplificazione.
10. Eseguire la PCR utilizzando il seguente programma su un termociclatore:
   - 95 °C per 3 minuti
   - 25 cicli di:
     — 95 °C per 30 secondi
     — 62 °C per 30 secondi
     — 72 °C per 60 secondi
   - 72 °C per 5 minuti
   - Mantenere a 10 °C

PUNTO DI ARRESTO SICURO
Se non si procede immediatamente alla pulizia della PCR, la piastra **AMP** può restare sul termociclatore per la notte oppure può essere conservata a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C per massimo 48 ore.

Pulizia della PCR

Questo processo consiste nel purificare i prodotti della PCR dagli altri componenti della reazione mediante le microsfere per la pulizia della PCR.

Tempo stimato

- Durata totale: 50 minuti
- Tempo di intervento dell'operatore: 20 minuti

Materiali di consumo

Elemento	Quantità	Conservazione	Fornito da
Tampone di eluizione	1 provetta	tra 15 °C e 30 °C	Illumina
Microsfere per la pulizia della PCR	400 µl per 8 campioni	tra 2 °C e 8 °C	Illumina
Etanolo all'80% preparato al momento	5 ml per 8 campioni	tra 15 °C e 30 °C	Utente
Piastre MIDI a 96 pozzetti	2	tra 15 °C e 30 °C	Utente
Sigillo adesivo per piastre	Come necessario	tra 15 °C e 30 °C	Utente
Vaschette	Come necessario	tra 15 °C e 30 °C	Utente

Preparazione

NOTA
Rileggere la sezione **Precauzioni** all'inizio del presente protocollo sulla gestione delle microsfere magnetiche e sul lavaggio con etanolo all'80% durante la pulizia della PCR.

1. Portare le microsfere per la pulizia della PCR a temperatura ambiente.
2. Preparare al momento etanolo all'80% a partire dall'etanolo assoluto.

NOTA
Preparare sempre al momento l'etanolo all'80% per le fasi di lavaggio. L'etanolo può assorbire l'acqua dall'aria e influire sui risultati.

Procedura

1. Centrifugare la piastra AMP a 1.000 x g a 20 °C per 1 minuto per raccogliere il condensato.
2. Etichettare la nuova piastra MIDI "**CLP_Plate_ID**" (Piastra di pulizia).
3. Capovolgere 10 volte le microsfere per la pulizia della PCR. Agitare energicamente e quindi capovolgere ancora 10 volte.
4. Controllare visivamente la soluzione per assicurarsi che le microsfere siano ben risospese.
5. Utilizzando una pipetta multicanale, aggiungere 45 µl di microsfere per la pulizia della PCR a ogni pozzetto di campione della piastra **CLP**.
6. Utilizzando una pipetta multicanale impostata su 60 µl, trasferire il prodotto per PCR dalla piastra AMP alla piastra **CLP**. Sostituire le punte quando si passa da un campione all'altro.
7. Sigillare la piastra **CLP** con un sigillo adesivo per piastre.
8. Agitare la piastra **CLP** su un agitatore per micropiastre a 1.800 rpm per 2 minuti.
9. Incubare a temperatura ambiente (da 15 °C a 30 °C) senza agitare per 10 minuti.
10. Posizionare la piastra su un supporto magnetico per un minimo di 2 minuti o fino alla scomparsa del surnatante.
11. Con la piastra **CLP** sul supporto magnetico e una pipetta multicanale impostata su 100 µl, rimuovere attentamente e smaltire il surnatante. Sostituire le punte quando si passa da un campione all'altro.

NOTA
Qualora nelle punte vengano inavvertitamente aspirate delle microsfere, dispensare nuovamente queste ultime sulla piastra e lasciare riposare la piastra sul magnete per 2 minuti o controllare che il surnatante sia scomparso.

12 Con la piastra **CLP** sul supporto magnetico, lavare le microsfere con etanolo all'80% appena preparato come segue:
   a Con una pipetta multicanale, dispensare 200 µl di etanolo all'80% appena preparato in ciascun pozzetto contenente il campione. Non è necessario sostituire le punte se si fa attenzione a evitare la contaminazione incrociata. In questa fase non occorre risospendere le microsfere.
   b Incubare la piastra sul supporto magnetico per un minimo di 30 secondi o finché il surnatante è limpido.
   c Rimuovere attentamente e smaltire il surnatante.

13 Con la piastra **CLP** sul supporto magnetico, eseguire un secondo lavaggio come segue:
   a Con una pipetta multicanale, dispensare 200 µl di etanolo all'80% appena preparato in ciascun pozzetto contenente il campione.
   b Incubare la piastra sul supporto magnetico per un minimo di 30 secondi o finché il surnatante è limpido.
   c Rimuovere attentamente e smaltire il surnatante.

14 Utilizzare una pipetta multicanale P20 impostata su 20 µl per rimuovere l'eccesso di etanolo.

15 Rimuovere la piastra **CLP** dal supporto magnetico e asciugare all'aria le microsfere per 10 minuti.

16 Con una pipetta multicanale, dispensare 30 µl di tampone di eluizione in ciascun campione e agitare brevemente.
   Non è necessario sostituire le punte se si fa attenzione a evitare la contaminazione incrociata.

17 Sigillare la piastra con un sigillo adesivo per piastre.

18 Agitare la piastra **CLP** su un agitatore per micropiastre a 1.800 rpm per 2 minuti.

NOTA
Assicurarsi che tutti i campioni siano completamente risospesi. Se vi sono campioni in cui le microsfere non sono completamente risospese, pipettare delicatamente su e giù per risospenderle e ripetere i due passaggi precedenti.

19 Incubare a temperatura ambiente (da 15 °C a 30 °C) per 2 minuti.

20 Posizionare la piastra **CLP** sul supporto magnetico per un minimo di 2 minuti o finché il surnatante è limpido.

21 Etichettare la nuova piastra MIDI "**LNP_Plate_ID**" (Piastra di normalizzazione della libreria).

22 Utilizzando una pipetta multicanale P20 e punte fini, trasferire delicatamente 20 µl di surnatante dalla piastra **CLP** alla piastra **LNP**. Cambiare le punte tra i campioni onde evitare una contaminazione incrociata.

NOTA

Qualora nelle punte vengano inavvertitamente aspirate delle microsfere, ridispensare queste ultime sulla piastra e lasciare riposare la piastra sul magnete per 2 minuti o controllare che il surnatante sia scomparso.

23 [Opzionale] Trasferire i restanti 10 µl di surnatante dalla piastra **CLP** a una nuova piastra ed etichettare la piastra con il nome della corsa e la data. Conservare questa piastra a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C fino al completamento della corsa di sequenziamento e analisi dei dati. I prodotti per PCR puliti possono essere usati per scopi di ricerca ed eliminazione guasti in caso di problemi a carico dei campioni.

24 Se ci si ferma a questo punto, sigillare la piastra **LNP** con un sigillo adesivo, quindi centrifugare a 1.000 x g a 20 °C per 1 minuto per garantire che tutto il surnatante si trovi in fondo al pozzetto.

PUNTO DI ARRESTO SICURO

Dopo la pulizia della PCR, la piastra è stabile per circa 3 ore a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C.

Normalizzazione della libreria

Questo processo consiste nel normalizzare la quantità di ciascuna libreria per garantire una rappresentazione più equilibrata nel pool di campioni.

Tempo stimato

- Durata totale: 1 ora e 20 minuti
- Tempo di intervento dell'operatore: 30 minuti

Materiali di consumo

Elemento	Quantità	Conservazione	Fornito da
Diluente normalizzazione libreria	1 provetta	tra -25 °C e -15 °C	Illumina
Microsfere libreria	1 provetta	tra 2 °C e 8 °C	Illumina
Lavaggio di normalizzazione della libreria	2 provette	tra 2 °C e 8 °C	Illumina
Tampone di conservazione della libreria	1 provetta	tra 15 °C e 30 °C	Illumina
0,1 N NaOH preparato al momento	2 ml per 48 campioni	tra 15 °C e 30 °C	Utente
Piastra skirted per PCR a 96 pozzetti	1 piastra	tra 15 °C e 30 °C	Utente
Provetta conica da 15 ml	1 provetta	tra 15 °C e 30 °C	Utente
Sigillo adesivo per piastre	Come necessario	tra 15 °C e 30 °C	Utente

AVVERTENZA

Questo set di reagenti contiene formammide, una ammide alifatica che è una probabile tossina riproduttiva. L'inalazione, l'ingestione, il contatto con la pelle o con gli occhi possono causare lesioni personali. Smaltire i contenitori e i contenuti non utilizzati in conformità alle norme locali di sicurezza vigenti.

Per ulteriori informazioni, vedere le SDS per questo kit, all'indirizzo support.illumina.com/sds.ilmn.

Preparazione

1 Preparare 0,1N di NaOH fresco aggiungendo 30 µl di 10 N di NaOH a 2.970 µl di acqua sterile.

2 Prelevare il diluente normalizzazione libreria dalla temperatura di conservazione tra -25 °C e -15 °C e portare a temperatura ambiente. Utilizzare un bagnomaria tra 20 °C e 25 °C in base al bisogno.

NOTA
Il diluente normalizzazione libreria potrebbe formare precipitati o cristalli visibili. Prima dell'uso, agitare energicamente, quindi porre la provetta davanti a una luce ed eseguire un controllo visivo per assicurarsi che tutti i precipitati si siano completamente sciolti.

3 Prelevare le microsfere libreria e il lavaggio di normalizzazione della libreria dalla temperatura conservazione compresa tra 2 °C e 8 °C e portare a temperatura ambiente.
Utilizzare un bagnomaria tra 20 °C e 25 °C in base al bisogno.

4 Agitare le microsfere libreria energicamente per 1 minuto con inversione intermittente fino a risospensione delle microsfere e assenza di pellet sul fondo della provetta quando quest'ultima viene capovolta.

Procedura

1 Dispensare 394 µl di diluente normalizzazione libreria in una provetta nuova da 1,5 ml.

2 Utilizzare una pipetta P1000 impostata su 1.000 µl per risospendere completamente le microsfere libreria pipettando su e giù 10 volte.

NOTA
È fondamentale risospendere completamente il pellet di microsfere della libreria in fondo alla provetta. L'uso di una provetta P1000 garantisce che le microsfere vengano risospese in modo omogeneo e che non ci sia massa di microsfere sul fondo della provetta. Questo è fondamentale per ottenere una densità dei cluster omogenea sulla cella a flusso.

3 Pipettare 72 µl di microsfere libreria nella provetta contenente il diluente normalizzazione libreria. Miscelare bene capovolgendo la provetta 15-20 volte.

NOTA
Per risospendere le microsfere completamente nella fase 2 è necessaria una provetta P1000 impostata su 1.000 µl. Miscelare solo le quantità richieste di diluente normalizzazione libreria e microsfere libreria per il saggio corrente. È necessario conservare il diluente normalizzazione libreria e le microsfere libreria residui separatamente alle temperature rispettivamente raccomandate. Per conservare la stabilità, le microsfere libreria non devono mai essere congelate o miscelate con il diluente normalizzazione libreria qualora non vengano utilizzate immediatamente.

4. Utilizzando una pipetta multicanale, dispensare 45 µl della soluzione di lavoro di diluente normalizzazione libreria/microsfere libreria combinata in ogni pozzetto della piastra **LNP** contenente le librerie. Non è necessario cambiare le punte quando si cambia colonna se si fa attenzione a evitare la contaminazione incrociata.
5. Sigillare la piastra **LNP** con un sigillo adesivo per piastre.
6. Agitare la piastra **LNP** su un agitatore per micropiastre a 1.800 rpm per 30 minuti.

NOTA
Questa incubazione di 30 minuti è fondamentale per una corretta normalizzazione della libreria. Le incubazioni con una durata superiore o inferiore ai 30 minuti possono influenzare la rappresentazione della libreria e la densità dei cluster.

7. Posizionare la piastra su un supporto magnetico per un minimo di 2 minuti o fino alla scomparsa del surnatante.
8. Con la piastra **LNP** sul supporto magnetico, utilizzando una pipetta multicanale impostata su 80 µl, rimuovere attentamente e smaltire il surnatante in un apposito contenitore per rifiuti pericolosi.

NOTA
Qualora nelle punte vengano inavvertitamente aspirate delle microsfere, ridispensare queste ultime sulla piastra e lasciare riposare la piastra per 2 minuti o fino alla scomparsa del surnatante.

9 Rimuovere la piastra **LNP** dal supporto magnetico e lavare le microsfere con il lavaggio di normalizzazione della libreria come segue:
   a Con una pipetta multicanale, dispensare 45 µl di lavaggio di normalizzazione della libreria in ciascun pozzetto contenente il campione.
     Non è necessario cambiare le punte quando si cambia colonna se si fa attenzione a evitare la contaminazione incrociata.
   b Sigillare la piastra **LNP** con un sigillo adesivo per piastre.
   c Agitare la piastra **LNP** su un agitatore per micropiastre a 1.800 rpm per 5 minuti.
   d Posizionare la piastra sul supporto magnetico per un minimo di 2 minuti o finché il surnatante è limpido.
   e Rimuovere attentamente e smaltire il surnatante in un apposito contenitore per rifiuti pericolosi.

10 Rimuovere la piastra **LNP** dal supporto magnetico e ripetere il lavaggio con lavaggio di normalizzazione della libreria come segue:
   a Con una pipetta multicanale, dispensare 45 µl di lavaggio di normalizzazione della libreria in ciascun pozzetto.
     Non è necessario cambiare le punte quando si cambia colonna se si fa attenzione a evitare la contaminazione incrociata.
   b Sigillare la piastra **LNP** con un sigillo adesivo per piastre.
   c Agitare la piastra **LNP** su un agitatore per micropiastre a 1.800 rpm per 5 minuti.
   d Posizionare la piastra sul supporto magnetico per un minimo di 2 minuti.
   e Rimuovere attentamente e smaltire il surnatante in un apposito contenitore per rifiuti pericolosi.

11 Utilizzare una pipetta multicanale P20 impostata su 20 µl per rimuovere l'eccesso di lavaggio di normalizzazione della libreria.

12 Rimuovere la piastra **LNP** dal supporto magnetico e dispensare 30 µl di 0,1 N di NaOH in ogni pozzetto per eluire il campione.

13 Sigillare la piastra **LNP** con un sigillo adesivo per piastre.

14 Agitare la piastra **LNP** su un agitatore per micropiastre a 1.800 rpm per 5 minuti.

15 Durante l'eluizione di 5 minuti, etichettare una nuova piastra per PCR con 96 pozzetti **SGP_Plate_ID** (Piastra StoraGe).

16 Dispensare 30 µl di tampone di conservazione della libreria a ciascun pozzetto da usare nella piastra **SGP**.

17 Dopo l'eluizione di 5 minuti, assicurarsi che tutti i campioni nella piastra **LNP** siano completamente risospesi. Se i campioni non sono completamente risospesi, pipettare delicatamente i campioni su e giù oppure battere delicatamente la piastra sul banco per risospendere le microsfere, quindi agitare per altri 5 minuti.

18 Posizionare la piastra **LNP** sul supporto magnetico per un minimo di 2 minuti.

19 Utilizzando una pipetta multicanale impostata su 30 µl, trasferire il surnatante dalla piastra **LNP** alla piastra **SGP**. Pipettare delicatamente su e giù 5 volte per miscelare.

NOTA
Qualora nelle punte vengano inavvertitamente aspirate delle microsfere, ridispensare queste ultime sulla piastra e lasciare riposare la piastra sul magnete per 2 minuti o controllare che il surnatante sia scomparso.

20 Sigillare la piastra **SGP** con un sigillo adesivo per piastre e quindi centrifugare a 1.000 x g a 20 °C per 1 minuto.

PUNTO DI ARRESTO SICURO
Qualora non si proceda immediatamente alla creazione di un pool di librerie e al successivo sequenziamento su MiSeqDx, conservare la piastra **SGP** sigillata tra -25 °C e -15 °C per un massimo di 3 giorni.

Creazione di pool di librerie

Nella preparazione per la generazione e il sequenziamento dei cluster, vengono combinati volumi uguali di librerie normalizzate, diluite in un tampone di ibridazione e denaturate mediante calore prima di essere sottoposte a sequenziamento su MiSeqDx. Il campione di controllo PhiX è usato a fini di verifica interna per il sequenziamento.

Tempo stimato

- Durata totale: 10 minuti
- Tempo di intervento dell'operatore: 10 minuti

Materiali di consumo

Elemento	Quantità	Conservazione	Fornito da
Tampone di diluizione libreria	1 provetta	tra -25 °C e -15 °C	Illumina
10 nM controllo interno PhiX	2 µl	tra -25 °C e -15 °C	Illumina
0,1 N NaOH preparato al momento	1 ml	tra 15 °C e 30 °C	Utente
1X tampone TE	8 µl	tra 15 °C e 30 °C	Utente
Provette Eppendorf (sono consigliate quelle con tappo a vite)	2 provette	tra 15 °C e 30 °C	Utente
Striscia a otto provette per PCR	1	tra 15 °C e 30 °C	Utente
Portaghiaccio da 2,5 l	1	tra 15 °C e 30 °C	Utente

Preparazione del pool di librerie

1 Predisporre un blocco termico adatto a centrifugare provette da 1,5 ml a 96 °C.

2 In un portaghiaccio, preparare un bagno di acqua e ghiaccio. Raffreddare il tampone di diluizione libreria nel bagno di acqua e ghiaccio.

3 Cominciare a scongelare la cartuccia di reagente MiSeqDx

Preparazione di una soluzione di diluizione fresca di NaOH

ATTENZIONE
L'utilizzo di una soluzione di diluizione fresca di NaOH è essenziale per denaturare completamente i campioni in vista della generazione dei cluster sul dispositivo MiSeqDx.

Per denaturare i campioni, preparare 1 ml di 0,1 N NaOH. Preparando un volume di 1 ml si evita che errori di pipettaggio su volumi piccoli influenzino la concentrazione finale di NaOH.

1 Combinare i seguenti volumi in una provetta per microcentrifuga:
- Acqua priva di DNAsi e di RNAsi (900 µl)
- 1,0 N di NaOH (100 µl)

2 Capovolgere la provetta diverse volte per miscelare.

Denaturazione e diluizione del controllo interno PhiX

1 Combinare i seguenti volumi per diluire la libreria del controllo interno PhiX a 2 nM:
- Libreria del controllo interno PhiX da 10 nM (2 µl)
- 1X tampone TE (8 µl)

2 Combinare i seguenti volumi di libreria del controllo interno PhiX da 2 nM e 0,1 N di NaOH in una provetta per microcentrifuga in modo da ottenere una libreria del controllo interno PhiX da 1 nM:
- Libreria del controllo interno PhiX da 2 nM (10 µl)
- 0,1 N NaOH (10 µl)

3 Inserire brevemente in un agitatore per miscelare la soluzione della libreria del controllo interno PhiX da 1 nM.

4 Centrifugare la soluzione di templato a 280 x g a 20 °C per 1 minuto.

5 Incubare per 4,5 minuti a temperatura ambiente per denaturare la libreria del controllo interno PhiX in filamenti singoli.

6 Aggiungere il seguente volume di tampone di diluizione libreria pre-raffreddato nella provetta contenente la libreria del controllo interno PhiX denaturata per ottenere una libreria del controllo interno PhiX da 20 pM.
   - Libreria del controllo interno PhiX denaturata (20 µl)
   - Tampone di diluizione libreria pre-raffreddato (980 µl)

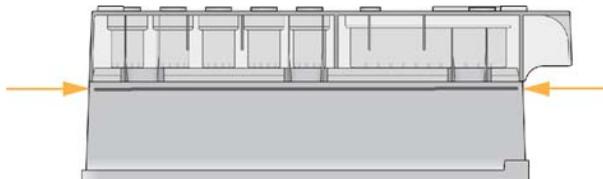
NOTA
La libreria del controllo interno PhiX da 20 pM denaturata può essere conservata fino a tre settimane tra -25 °C e -15 °C in aliquote singole. Dopo tre settimane, il numero dei cluster tende a diminuire.

Preparazione della cartuccia di reagenti

Le istruzioni che seguono descrivono come scongelare la cartuccia di reagenti utilizzando un bagnomaria a temperatura ambiente. Il metodo richiede circa un'ora.

1 Rimuovere la cartuccia di reagenti dal luogo di conservazione con temperatura tra -25 °C e -15 °C.

2 Collocare la cartuccia di reagenti in un bagnomaria contenente abbastanza acqua deionizzata a temperatura ambiente da immergere la base della cartuccia di reagenti fino alla linea di livello acqua stampata sulla cartuccia stessa. Evitare che l'acqua superi la linea di massimo livello acqua.

Figura 7 Linea di massimo livello acqua

3 Lasciare la cartuccia di reagenti a scongelare a bagnomaria a temperatura ambiente per circa un'ora o fino a completo scongelamento.

4 Rimuovere la cartuccia dal bagnomaria e batterla delicatamente sul banco per far fuoriuscire l'acqua in eccesso dalla base. Asciugare la base della cartuccia. Verificare che sulla parte superiore della cartuccia di reagenti non sia caduta dell'acqua.

Ispezione della cartuccia di reagenti

1 Capovolgere la cartuccia dieci volte per miscelare i reagenti scongelati e poi ispezionare visivamente tutti i serbatoi per accertarsi che siano scongelati.

NOTA
È fondamentale che i reagenti nella cartuccia siano scongelati completamente e miscelati per assicurare il sequenziamento corretto.

2 Ispezionare visivamente il reagente nella posizione 1 per accertarsi che sia ben miscelato e privo di precipitati.

3 Battere delicatamente la cartuccia sul banco per ridurre le bolle d'aria nei reagenti.

NOTA
I tubi dei pescanti del MiSeqDx vanno fino al fondo di ciascun serbatoio per aspirare i reagenti, per questa ragione è importante che i serbatoi non contengano bolle.

4 Riporre la cartuccia in ghiaccio o conservarla a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C (fino a 6 ore) finché non si è pronti a impostare la corsa. Per risultati ottimali, procedere direttamente caricando il campione e impostando la corsa.

Preparazione dei campioni per il sequenziamento

1 Portare il tampone di diluizione libreria a temperatura ambiente. Agitare il tampone di diluizione libreria energicamente e assicurarsi che tutti i precipitati si siano completamente sciolti.

2 Se la piastra **SGP** è stata conservata congelata, scongelarla la piastra **SGP** fino a raggiungere la temperatura ambiente.

3 Centrifugare la piastra **SGP** a 1.000 x g a 20 °C per 1 minuto per raccogliere il condensato.

4 Etichettare una provetta Eppendorf nuova con "**PAL_Plate_ID**" (Pooled Amplicon Library, libreria di ampliconi raggruppati in pool).

5 Se la piastra **SGP** è stata conservata congelata, utilizzare una pipetta multicanale P200 impostata su 40 µl per mescolare ciascuna libreria da sequenziare

pipettando su e giù per 3-5 volte. Sostituire le punte quando si passa da un campione all'altro.

6 Trasferire 5 µl di ciascuna libreria da sequenziare dalla piastra **SGP** a una striscia a otto provette per PCR. Sigillare l'**SGP** con un sigillo adesivo per piastre e metterla da parte.

NOTA
Dopo l'uso, conservare la piastra **SGP** fra -25 °C e -15 °C. La piastra **SGP** sigillata rimane stabile per un massimo di 3 giorni.

7 Combinare e trasferire il contenuto della striscia a otto provette per PCR nella provetta **PAL**. Miscelare energicamente la provetta **PAL** in un agitatore.

8 Etichettare una provetta Eppendorf nuova con "**DAL_Plate_ID**" (Diluted Amplicon Library, libreria di ampliconi diluita).

9 Dispensare 585 µl di tampone di diluizione libreria nella provetta **DAL**.

10 Dispensare 6 µl di controllo interno PhiX 20 pM nella provetta **DAL**. Con la stessa punta, pipettare su e giù per 3-5 volte per sciacquare la punta e assicurare che il trasferimento sia completo.

11 Trasferire 9 µl di **PAL** nella provetta **DAL** contenente il tampone di diluizione libreria. Con la stessa punta, pipettare su e giù per 3-5 volte per sciacquare la punta e assicurare che il trasferimento sia completo.

12 Mescolare la **DAL** agitando la provetta molto velocemente.

NOTA
Se si desidera conservare la restante **PAL** per utilizzarla in futuro, porre la provetta **PAL** a una temperatura fra -25 °C e -15 °C. La **PAL** si conserva bene per 3 giorni.

La libreria diluita **DAL** deve essere preparata al momento e utilizzata immediatamente per caricare il MiSeqDx. Se conservata, la **DAL** può comportare una riduzione significativa della densità dei cluster.

13 Centrifugare la provetta **DAL** a 1.000 x g a 20 °C per 1 minuto per raccogliere il contenuto.

14 Incubare la provetta **DAL** in un blocco termico a 96 °C per 2 minuti.

15 Dopo l'incubazione, capovolgere la provetta **DAL** 1-2 volte per mescolarla, quindi porla immediatamente in un bagno di acqua e ghiaccio.

16 Tenere la provetta **DAL** nel bagno di acqua e ghiaccio per 5 minuti.

NOTA
È necessario eseguire la fase di denaturazione mediante calore immediatamente prima di caricare la **DAL** nella cartuccia di reagente del MiSeqDx per assicurare che il templato sia caricato in modo efficace sulla cella a flusso del MiSeqDx.

Le novità

Una volta raggruppate in pool le librerie di ampliconi con il PhiX diluito e denaturato, le librerie sono pronte per essere caricate sulla cartuccia MiSeqDx - saggio CF Clinical Sequencing nell'apposito serbatoio etichettato con **Load Samples** (Carica campioni). La corsa di sequenziamento viene quindi impostata mediante l'interfaccia software operativo MiSeq (MOS). Vedere la *Guida di consultazione per lo strumento MiSeqDx (n. codice 15038353_ITA)* per istruzioni al riguardo.

Assistenza tecnica

Per assistenza tecnica, contattare l'Assistenza tecnica Illumina.

Tabella 11 Dati di contatto generali Illumina

Sito Web Illumina	www.illumina.com
E-mail	techsupport@illumina.com

Tabella 12 Numeri di telefono Assistenza clienti Illumina

Area geografica	Numero di contatto	Area geografica	Numero di contatto
Nord America	1.800.809.4566	Italia	800.874909
Austria	0800.296575	Norvegia	800.16836
Belgio	0800.81102	Paesi Bassi	0800.0223859
Danimarca	80882346	Regno Unito	0800.917.0041
Finlandia	0800.918363	Spagna	900.812168
Francia	0800.911850	Svezia	020790181
Germania	0800.180.8994	Svizzera	0800.563118
Irlanda	1.800.812949	Altri paesi	+44.1799.534000

Schede di sicurezza sui materiali (MSDS)

Le schede di sicurezza sui materiali (MSDS) sono disponibili sul sito Web Illumina all'indirizzo support.illumina.com/sds.ilmn.

Documentazione dei prodotti

La documentazione dei prodotti in formato PDF può essere scaricata dal sito Web Illumina. Andare al sito support.illumina.com e selezionare un prodotto, quindi fare clic su **Documentation & Literature** (Documentazione e letteratura).